

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/59068 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation?: C12N 5/00, A61K 35/12, A61L 27/38, A61P 19/00, 41/00 (74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, 10315 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/00530 (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 7. Februar 2001 (07.02.2001) (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 06 822.7 8. Februar 2000 (08.02.2000) DE
- (71) Anmelder und (72) Erfinder: SITTINGER, Michael [DE/DE]; Karl-Marx-Strasse 147 d, 15831 Grossziethen (DE). SCHULTZ, Olaf [DE/DE]; Steinstrasse 10, 10119 Berlin (DE).
- Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ARTIFICIAL BONE CHIPS, METHODS FOR THE PRODUCTION THEREOF AND THEIR USE

WO 01/59068 A2 (54) Bezeichnung: KÜNSTLICHE KNOCHENCHIPS, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to artificial bone chips (BFU = bone forming units), to cartilage transplants and bone transplants, to methods for the production thereof, and to their use in field of surgery. The artificial bone chips are comprised of bioresorbable or biocompatible structures consisting of fibrin or hydrogel, of osteogenic cells and factors, such as growth factors or osteogenic bioactive factors, and are shaped to form geometric bodies that can be assembled.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft künstliche Knochenchips (BFU = bone forming units), Knorpel- und Knochentransplantate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung in der Chirurgie. Sie bestehen aus bioresorbierbaren oder biokompatiblen Gerüststrukturen, die aus Fibrin oder Hydrogel, osteogenen Zellen und Faktoren - wie Wachstumsfaktoren oder osteogenen bioaktiven Faktoren - bestehen, die zu aneinandersetzbaren geometrischen Körpern geformt werden.

BEST AVAILABLE COPY

## Künstliche Knochenchips, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

### Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft künstliche Knochenchips (BFU = bone forming units), Knorpel- und Knochentransplantate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung in der Chirurgie.

Die Reparatur umschriebener Defekte im Gelenkknorpel (z. B. Sportverletzungen) wurde innerhalb der letzten Jahre bereits zur klinischen Routine. Um aber in Zukunft auch ganze  
10 zerstörte Gelenkknorpelflächen zu reparieren, wie sie gewöhnlich infolge schwerer chronischer Gelenkerkrankungen auftreten, müssen weitgehend vorgefertigte und stabile Ersatzgewebe bis hin zu komplexen vitalen "Bioprothesen" entwickelt werden. Dazu versucht man, Patientenzellen mit unterschiedlichen Gerüst-, Stütz- oder Einbettmaterialien zu kombinieren. Diese werden jedoch nur temporär für Form und Stabilität benötigt und lösen  
15 sich später im Körper wieder vollständig auf. Für die Zell- und Gewebekulturen müssen zuvor spezielle Bedingungen geschaffen werden, unter denen die dem Patienten entnommenen Zellen auch nach einer ausreichenden in vitro Vermehrung wieder die gewebespezifischen Eigenschaften entwickeln (Literaturverzeichnis 1, 2).

Neuerdings wird vermehrt die Verwendung von Gewebevorläufer- und Stammzellen für die  
20 Transplantatzüchtung angestrebt. Deren Potential zur Proliferation und Differenzierung ist hochinteressant für die Regeneration von Geweben und Organen mit Hilfe des Tissue Engineerings. So gelang es bereits, mesenchymale Vorläuferzellen der Knochenhaut zur Behandlung von Knorpel- und besonders auch Knochendefekten in Tiermodellen erfolgreich einzusetzen. Dazu werden in dreidimensionalen Kulturen mittels geeigneter Matrixstrukturen  
25 aus Fibrin, Alginat und Polymergerüststrukturen die Zellen zu transplantierbaren Vorläufergeweben gezüchtet (3, 4, 5).

Bislang stellt die Substitution von knöchernen Defekten, wie sie Zysten oder insbesondere die große Zahl riesiger periprotektischer Knochendefekte bei Prothesenlockerungen darstellen, ein  
zentrales Problem in der Orthopädie dar. Die bislang geübte Praxis der Defektfüllung mit  
30 avitalem allogenem Material ist unbefriedigend. Zusätzlich bleibt trotz aller Möglichkeiten der Aufarbeitung ein Restrisiko der Übertragung von Infektionserregern bestehen (Viren, Prionen). Vereinfacht kann festgestellt werden, dass je radikaler devitalisierend die

präoperative Behandlung des zu transplantierenden Substrates aus Infektionsgründen ist, die biologische Wertigkeit des Transplantates abnimmt.

Die Probleme der Prothesenlockerung und begrenzten Haltbarkeit führen dazu, dass vor allem junge Menschen erst relativ spät operativ versorgt werden können und die Invalidisierung  
5 meist schon weit fortgeschritten ist. Durch die Entwicklung von künstlichem Knorpel- und Knochengewebe, das durch Transplantation zerstörte Gelenke ersetzen kann, wird praktisch eine neue Dimension für die rekonstruktive Gelenkchirurgie eröffnet. Diese kommt vor allem für junge, im Berufsleben stehende Menschen als eine wichtige Alternative in Betracht, da hier die begrenzte Lebensdauer der Endoprothesen viel größere Risiken für Komplikationen  
10 im weiteren Verlauf mit der Gefahr einer frühzeitigen Amputation birgt. Weiterhin ist die gentechnische Stabilisierung des künstlichen Knorpels und Knochens für die entzündlichen Gelenkerkrankungen eine Grundvoraussetzung, um eine erfolgreiche Einheilung und einen langfristig funktionstüchtigen physiologischen Gelenkersatz mit Hilfe des Tissue Engineerings zu entwickeln.

15 Um aus isolierten Patientenzellen ein dreidimensionales Gewebe von ausreichender Größe herzustellen, muß ein Trägermaterial eingesetzt werden, in das man isolierte und in vitro vermehrte Chondrocyten einbringen kann, so dass diese wieder redifferenzieren, ausreichend extrazelluläre Matrix bilden und damit für die Transplantation oder als Gewebemodelle für die Grundlagenforschung zur Verfügung stehen. Folgende Anforderungen werden dabei an  
20 die Trägermaterialien gestellt:

Zuallererst sollten die verwendeten Materialien biokompatibel sein, das heißt, dass sie weder eine immunologische Abstoßungsreaktion bei der Verwendung in Implantaten verursachen, noch durch ihre Anwesenheit die normale Stoffwechselaktivität der Zellen beeinträchtigen dürfen. Des weiteren sollte die dreidimensionale homogene Verteilung der Zellen im Träger  
25 und das räumliche Reifen des Zellgewebes ermöglicht werden, in dem z.B. neu gebildete Matrixmoleküle im zellnahen Raum gehalten werden. Daher wäre es sinnvoll, wenn das Material eine möglichst große Oberfläche zur Zelladhäsion und Aggregation der Matrixmoleküle bei minimalem Volumen und eine homogene Struktur besitzt und dabei trotz Formbarkeit noch eine ausreichende Formstabilität z.B. für den Einsatz in der plastischen  
30 Chirurgie aufweist. Sobald das neue Gewebe in sich stabil genug ist, wird das Trägermaterial überflüssig und sollte daher resorbieren, wobei die Degradationsprodukte wiederum keinen Einfluß auf die Stoffwechselaktivität des Gewebes haben dürfen (6).

Die in vitro Gewebeherstellung erfordert also zwei Funktionskomponenten vom Trägermaterial. Die eine Komponente ist für die mechanische Stabilität verantwortlich. Die andere sorgt für eine homogene Verteilung der Zellen in der Struktur und unterstützt die Ausbildung der extrazellulären Matrix, indem das Material den Matrixmolekülen Halt gibt.

5 Beide Funktionen können von ein und der selben oder von verschiedenen Gerüstsubstanzen übernommen werden (7).

Im folgenden werden unter diesen Gesichtspunkten einige Entwicklungsansätze sowie mögliche Gerüststrukturen und Einbettmaterialien für das Knorpel-Tissue Engineering genauer betrachtet.

#### 10 1. Fasern

Am ehesten werden Polymerfaser-Konstrukte diesen Ansprüchen gerecht. Die resorbierbaren Polymerfasern mit reproduzierbaren Eigenschaften werden z.B. zu einem dreidimensionalen Vlies verwebt, sind dabei flexibel und elastisch und können dadurch den anatomischen Erfordernissen in der Form angepaßt werden. Sie bieten bei geringem Gewicht pro  
15 Volumeneinheit eine große innere Oberfläche und ermöglichen eine dreidimensionale Besiedlung durch die Zellen. Die Fasern haben die Aufgabe eines temporären Platzhalters, der sich nach dem Einwachsen der Knorpelzellen auflöst und durch die neu gebildete extrazelluläre Matrix ersetzt wird. Dabei nehmen die Polymervliesfasern in der ersten Zeit die Belastung auf. Während sie sich langsam auflösen, überlassen sie die Trägerfunktion der neu  
20 entstehenden Matrix.

Die Zellen müssen unempfindlich gegenüber den Degradationsprodukten der Fasern sein. Durch die geringe Materialmenge entstehen jedoch vergleichsweise wenig Abbauprodukte, die dann aus dem gebildeten Gewebe abtransportiert werden müssen.

Der Abbau der Polymere läuft nach folgendem Schema ab: Zunächst quillt das Material durch  
25 Wassereinlagerung auf. Dabei werden z.B. die Wasserstoffbrückenbindungen, die die räumliche Struktur der Polymere bestimmen, aufgelöst. Anschließend brechen die Polymerketten auseinander. Der Träger verliert seine mechanische Stabilität. Schließlich werden die niedermolekularen Fragmente über die körpereigenen Stoffwechselwege zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut (8).

30 Der Nachteil dieser Polymerfasern beispielsweise gegenüber Gelen besteht darin, dass die räumlich homogene Verteilung der Knorpelzellen erschwert ist.

Außerdem müssen die Zellen zusätzlich im Vlies fixiert werden, da sie das Bestreben haben, nach unten zu sinken. Die Fixierung kann entweder durch direktes Anhaften der

Chondrocyten an die Fasern, z. B. mit Hilfe von Adhäsionsfaktoren, oder durch eine leichte Vernetzung der Zellsuspension mit gelartigen Substanzen, wie z.B. Agarose, Fibrin oder Hyaluronsäure erfolgen, wobei letzteres zu Gunsten einer homogenen Verteilung der Zellen im Träger vorzuziehen ist. Der Zusatz geeigneter gelartiger Substanzen erlaubt es ferner, den mittleren Abstand der Fasern zu erhöhen, so dass die Gesamtmenge des resorbierbaren Polymers pro Gewebenvolumen weiter reduziert wird. Damit dienen die Fasern hauptsächlich als Gewebegerüst und weniger zur dreidimensionalen Zellverteilung. Die Zellen müssen daher auch nicht an die Fasern binden. Eine weitere Möglichkeit, Zellen - aber insbesondere die Matrixmoleküle - im Fasergewebe zu akkumulieren, ist das Einhüllen des Vlieses in eine semipermeable Membran (10, 11).

Zellen, die sich direkt an die Polymerfasern heften, wachsen und beginnen dann das Volumen zwischen den Fasern zu füllen. Diese an die Fasern adhären Zellen haben ein mehr spindelförmiges Aussehen, während die Zellen in den Zwischenräumen, die im Kontakt mit anderen Zellen stehen, eher der Chondrocyten-Morphologie entsprechen (12).

Als Fazit erfüllt eine Kombination aus Polymerfasern, die den ersten mechanischen Halt bieten, und einem Gel, in dem die Zellen zwischen den Fasern homogen verteilt werden, am ehesten die Anforderungen zur in vitro Herstellung eines präformierten Knorpeltransplants. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass vergleichbare Ansätze auch zur Herstellung von Knochentransplantaten genutzt werden können (13).

Das wohl berühmteste Beispiel für diese Methode der dreidimensionalen Zellkultivierung ist das von der Arbeitsgruppe Vacanti mit Hilfe des Tissue Engineering nachgebaute Ohr (US-Patent 5,041,138). Dabei wurde mit nicht verwebten Polyglycolid (PGA)-Fasern gearbeitet, die mit Polylactid (PLA) beschichtet waren. Dieses modellierte Ohrkonstrukt mit humanen Chondrocyten wurde einer Maus mit abgeschwächtem Immunsystem (ohne Thymus) subkutan implantiert und anfangs von außen gestützt. Dabei behielt es seine Form. In dem neu gebildeten Gewebe wurde Kollagen Typ II als Marker für hyalines Knorpelgewebe gefunden (14).

Ein anderer Ansatz ist die Kollagen-Matrix, die aus bovinem Kollagen Typ I hergestellt wird und daher naturgemäß schlecht reproduzierbare Eigenschaften besitzt (15). Sie bietet sehr gute Zellbindungsfähigkeiten. Zellen, die in einer Kollagen-Matrix kultiviert wurden, sehen rund aus und zeigen bei schwacher Proteoglykansynthese eine starke Kollagenproduktion, die über den Prolin-Einbau nachgewiesen wurde. Da die Kollagensynthese feedback-kontrolliert wird, könnte das Kollagen der Matrix allerdings auch als Substrat betrachtet werden. Wird Kollagen

ohne Zellen in einen Gelenkknorpel implantiert, wächst dieser zu. Das neu gebildete Gewebe sieht wie fibröses Gewebe aus und enthält sehr viel Kollagen, aber wenig Proteoglykane. Letztere haben jedoch eine große Bedeutung für die Druckelastizität (16).

## 5 2. Gele

Im Gegensatz zu den Polymerfasern besitzen die Gele keine ausreichende mechanische Stabilität. Hydrogele basieren auf verschiedenen strukturellen und physikochemischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix, die im Prinzip ebenfalls ein Gel aus Hyaluronsäure und Proteoglykanen ist, in das wiederum stützende Kollagenfasern eingebettet sind.

10 Agarosegele werden häufig für die Erforschung der Chondrogenese verwendet. Das Agarosegel ermöglicht einen großen Abstand zwischen den Zellen, so dass Matrixmoleküle Platz haben zu aggregieren (17, 18). Allerdings verbleiben große Moleküle, wie z.B. Aggrecan, im perizellulären Bereich, so dass eine interzelluläre Matrix nicht gebildet werden kann (19).

15 Das Fibringel wird seit 20 Jahren in der operativen Medizin verwendet. Es entspricht allen notwendigen Anforderungen seitens der Biokompatibilität und Infektionssicherheit. Allerdings hat das reine Fibringel nur eine begrenzte mechanische Stabilität. Deshalb ist es sinnvoll, dieses Gel durch ein Fasergerüst zu verstärken.

Ein PGA/PLA-Copolymervlies mit Fibringel gefüllt, ermöglicht eine homogene  
20 dreidimensionale Zellverteilung mit einem durchschnittlichen Zellabstand von 50 µm. Die Chondrocyten haben eine runde Form. Nach etwa sechs Wochen Kulturzeit löst sich die Vliesstruktur größtenteils auf, und die Bruchstücke des Vliesnetzes sind gleichmäßig in die extrazelluläre Knorpelmatrix eingebettet. Nach 14 Tagen kann Kollagen Typ II mit einem Antikörpertest nachgewiesen werden. Kollagen Typ I wurde nicht gefunden. Die kontrovers  
25 geführte Diskussion zur Infektionssicherheit industriell gefertigter Fibrinpräparate erübrigt sich bei Einsatz von autologem Fibrin (DE 198 24 306).

Alginate ist eine Immobilisierungsmatrix, in der die Chondrocyten über eine lange Kultivierungsdauer von bis zu acht Monaten ihren Phänotyp behalten. Im Alginategel bilden  
30 adulte humane Chondrocyten eine extrazelluläre Matrix. Alginatebeads mit autologen Chondrocyten subkutan implantiert (Minischwein), zeigen nach sechs Wochen ein distinktes Gewebe, umhüllt mit einer fibrösen Gewebekapsel. Ca. 30% bis 40% dieses Gewebes waren Knorpel (20). Die Alginate-Beads können auch mit einem Hyaluronsäuregel oder einem Fibringel kombiniert werden. Dann erhält man durch die Hyaluronsäure deutlich mehr Zellen

im Bead. Auch die Fibrinzugabe führt zu einem starken Anwachsen der Zellzahl (21). Allerdings ist hier noch zu klären, in wieweit die starke Proliferation die gewünschte Matrixbildung einschließt.

Die Verwendung von Alginat als Implantatträger erscheint jedoch fraglich, da auch hier das  
5 immunologische Verhalten des pflanzlichen Materials und die Infektionssicherheit noch ungeklärt und problematisch sind.

Hyaluronsäure (HA) wird durch Vernetzung der Hyaluronsäureketten zu einem brauchbaren Trägermaterial. In Abhängigkeit von der Art der Vernetzungsreaktion erhält man HA-Fasern oder HA-Gele. Die Arbeitsgruppe um Aigner verwendete z.B. nicht verwebte Fasern aus HA-Benzylester (J. Aigner, et al., Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured  
10 biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. J. Biomed Mater Res. 42, 172-181, (1998)). Diese Fasern degradieren nach zwei Monaten vollständig durch spontane Hydrolyse der Esterbindung bei 37°C. Humane Chondrocyten aus dem Nasenseptum haften schnell an diesen Fasern, proliferieren und füllen dabei die Zwischenräume zwischen den Fasern aus.  
15 Nach 33 Tagen leben mehr als 90% der Zellen, was auf eine sehr gute Biokompatibilität des Trägermaterials hinweist. Nach einem Monat wurde sowohl Kollagen Typ I als auch Kollagen Typ II exprimiert. Die Implantate behielten ihre Form.

Andere Vernetzungsreaktionen z.B. mit Bisepoxid-Komponenten, Formaldehyd oder Divinylsulfon produzieren HA-Gele. Viele Veröffentlichungen und Patente berichten, dass  
20 diese Hyaluronsäuregele in vivo biokompatibel und nicht toxisch sind (22, 23, 24, 25, 26).

Je geringer der Vernetzungsgrad des Gels ist, desto mehr Wasser können das Gel bzw. der HA-Film aufnehmen, was wiederum mit einer leichteren Biodegradation und einer schlechteren mechanischen Stabilität verbunden ist (27), wenn man dieses Gel allein bewegen will. Auf der anderen Seite ist jedoch ein hoher Wassergehalt für ein potentiell  
25 erwünschtes Implantat, da es im Gewebeverbund nur so dem Gewebestugor standhalten kann.

### 3. Einsatz morphogener Wachstumsfaktoren

Ein weiterer Ansatz im Tissue Engineering besteht darin, die Geweberegeneration insgesamt oder zumindest die Differenzierung der Zellen z.B. durch Zusatz von Wachstumsfaktoren zu stimulieren. Hierbei sind insbesondere Faktoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie (Transforming  
30 Growth Factor-beta) interessant, da sie bei der Entwicklung von Geweben und Organen eine zentrale Rolle spielen. Für das Tissue Engineering gibt es dabei sehr verschiedene Prinzipien, diese Faktoren einzusetzen. So können beispielsweise in einen Teil der Zellen Gene der TGF- $\beta$ -Familie eingeschleust werden, um die Ausreifung zu verbessern, aber auch um das Gewebe

z.B. in einem chronisch entzündeten Gelenk vor erneuter Zerstörung zu schützen (28, 29, 30, 31). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Release-Systemen, also der vorübergehenden Freisetzung von Faktoren aus resorbierbaren Mikropartikeln, um z.B. ein Transplantat während der kritischen Phase der Einheilung zu stabilisieren. Schließlich kann  
5 auch die direkte Geweberegeneration ohne Zellen ausschließlich durch Wachstumsfaktoren und Biomaterialien angewandt werden (32).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, weitgehend vorgefertigte und stabile Knochen- bzw. Knorpel-Ersatzgewebe bereitzustellen.

10 Die Aufgabe wurde durch die Herstellung künstlicher Knochenchips gelöst. Die erfindungsgemäßen künstlichen Knochenchips stellen flexible, resorbierbare, modulare Elemente mit Zellen und/oder Wachstumsfaktoren dar und eignen sich für den praktischen Einsatz von Knochen- und Knorpel-Tissue Engineering in der Chirurgie. Sie können genutzt werden, um Gewebedefekte unterschiedlichster räumlicher Ausdehnung zu behandeln bzw. zu  
15 füllen. Die künstlichen Knochenchips bestehen aus bioresorbierbaren oder biokompatiblen Trägermaterialien und/oder Gerüststrukturen. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie aus durch Fibrin oder Hydrogel vernetzten Kombinationen von osteogenen Zellen und Faktoren bestehen, die zu aneinandersetzbaren geometrischen Körpern geformt werden.

Sie bestehen aus porösen resorbierbaren oder nichtresorbierbaren Gerüststrukturen, wobei die  
20 Gerüststrukturen plastische und/oder elastische Anteile besitzen.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass die einzelnen Module (Knochenchips) auf unterschiedliche Weisen miteinander verbunden werden können. Sie besitzen eine Profilstruktur oder sind eine geschlossene Hohlstruktur. Das Chipmaterial selbst ist porös in einer Weise, dass Zellen, die durch Biopolymere vernetzt werden (z.B. Fibrin) im Material  
25 verteilt bzw. eingebracht werden können. Neben der Einbettungskomponente (z.B. Fibrin) kann der Zell-Lösung zusätzlich Calciumphosphat (z.B. alpha- oder beta-Tri-Kalziumphosphat) zugegeben werden.

Durch die Form und Verbindungen der Knochenchips entsteht letztlich eine dritte Ebene der Gerüststruktur. Die Ebenen sind:

- 30
1. Zellvernetzung durch Fibrin oder Hydrogel
  2. Die vernetzten Zellen sind in einem Fasergerüst stabilisiert und
  3. Die Fasergerüste werden als modulare Hohl- und Profilkörper zu einem Makrogerüst zusammengesetzt. Die Module können entweder in vitro mit Zellen kultiviert oder unmittelbar



vor oder nach Implantation durch Einspritzen in Hohlkörper/Hohlräume mit osteogenen Zellen oder Faktoren versetzt werden.

Die künstlichen Knochenchips sind modulartige Knochenersatzstrukturen auf der Basis von bioresorbierbaren oder biokompatiblen Trägermaterialien, die mit osteogenen Zellen oder Faktoren kombiniert - gefüllt, getränkt oder gekoppelt - werden können. Sie bestehen aus porösen resorbierbaren oder nichtresorbierbaren Gerüststrukturen. Vorzugsweise werden sie in geeigneten Formen eingesetzt, z.B. in Form von Würfeln oder Quadern (z.B. in mm 2x2x2 bis 4x4x2 oder 10x5x2). Auch mehreckige Formen sind möglich, z.B. Sechskant/wabenartige Fläche 1cm<sup>2</sup>). Sie können auch kugelförmig, linsenförmig oder band-/bindenartig gestaltet sein. Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung sind die künstlichen Knochenchips in ihrer Form röhrenförmig/zylinderförmige u- oder v-Profile bzw. Hohlprofile.

Die Gerüststrukturen können Stützstrukturen, d.h. Faserstrukturen oder Vliesstrukturen, oder Gitterstrukturen, verwebte Strukturen, Schaumstrukturen, Wattenstrukturen oder Strukturen mit interkonnektierender Porösität sein, die aus plastischen und elastischen Anteilen hergestellt werden. So enthält die Faserstruktur - Wolle oder Vlies - neben elastischen zusätzlich resorbierbare oder nicht-resorbierbare plastische verformbare Fasern, Bänder oder Stützdrähte. Die Stützstruktur der Knochenchips ist mehrphasig und besteht aus zwei oder mehreren der plastischen, elastischen und festen Phasen.

Die erfindungsgemäßen künstlichen Knochenchips können über Oberflächenprofile - z.B. Nut und Feder, Zacken, Spitzen, Löcher, Haken, Ösen oder klettverschlussartig - zusammen-gesteckt oder -gehakt werden.

Die künstlichen Knochenchips stellen weitgehend oder ganz geschlossene Hohlstrukturen mit permeablen Wänden dar, die durch Injektionen mit osteogenen bioaktiven Faktoren oder Zellen gefüllt werden können. Als Faktoren bzw. Zellen können FGF (fibroblast growth factor), TGF (transforming growth factor), BMP (bone morphogenetic protein), Periostzellen, mesenchymale Stammzellen oder Osteoprogenitor-Zellen eingesetzt werden.

Die Permeabilität der Wandstrukturen der erfindungsgemäßen Hohlchips wird entweder durch die Faser- oder Gitterstruktur oder durch zusätzlich aufgebrauchte resorbierbare oder nichtresorbierbare permeable Membranen erreicht.

Innerhalb eines zu behandelnden Knochendefekts werden unterschiedliche Knochenchips bzw. Hohlstrukturen mit unterschiedlichen Faktoren bzw. Zellen befüllt. Künstliche Knochenchips können vergleichbar oder ähnlich einem Klettverschluss auf Endoprothesen aufgebracht werden.

Das erfindungsgemäße Knochenersatzmodul kann mit andern künstlichen Gewebestrukturen, z.B. Knorpelersatz, kombiniert werden (z.B. osteochondrales Transplantat).

Die Knochenchips werden durch Fibrinkleber, Acrylatkleber oder Laktidkleber miteinander und/oder mit dem umgebenden Gewebe verbunden. Statt allgemeiner Fibrinkleber können  
5 auch autolog hergestelltes Fibrin bzw. Thrombin oder rekombinantes Fibrin bzw. Thrombin eingesetzt werden.

Poröse Knochenchips können mit Gelsubstanzen (Fibrin, Alginat, Hyaluronsäure, Kollagen, Agarose) kombiniert werden.

Die Knochenchips mit bioaktiven Elementen (Zellen und/oder Faktoren), die mit  
10 Gelsubstanzen kombiniert werden können, werden in Kulturmedien in vitro vorkultiviert.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der künstlichen Knochenchips besteht darin, dass Zellen oder Faktoren durch Fibrin oder Hydrogel vernetzt und die vernetzten Zellen in Gerüststrukturen, insbesondere in einem Fasergerüst, stabilisiert und zu  
15 aneinandersetzbaren geometrischen Körpern geformt werden. Anschließend werden die Fasergerüste als modulare Hohl- und Profilkörper zu einem Makrogerüst zusammengesetzt. Die Chips werden in vitro mit Zellen kultiviert oder unmittelbar vor oder nach der Implantation durch Einspritzen in Hohlkörper/Hohlräume mit osteogenen Zellen oder Faktoren versetzt. Ein weiteres Merkmal des Verfahrens besteht darin, daß die  
20 Trägermaterialien und/oder Gerüststrukturen mit osteogenen Zellen oder Faktoren kombiniert - gefüllt, getränkt und/oder gekoppelt - werden. Die Zellen oder Faktoren können vorkultiviert sein.

Die Merkmale der Erfindung gehen außer aus den Ansprüchen auch aus der Beschreibung hervor, wobei die einzelnen Merkmale jeweils für sich allein oder zu mehreren in Form von  
25 Kombinationen vorteilhafte schutzfähige Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird. Die Kombination besteht aus bekannten (Trägermaterialien, Trägerstrukturen) und neuen Elementen (modulartige Knochenersatzstrukturen, künstliche Knochenchips), die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Vorteil (synergistischen Effekt) und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, dass  
30 nunmehr weitgehend vorgefertigte und stabile Knorpel- bzw. Knochen-Ersatzgewebe zur Verfügung stehen.

Die erfindungsgemäße Verwendung der neuen künstlichen Knochenchips liegt im Bereich der Chirurgie, vor allem in der Behandlung von Knochendefekten, z.B. nach Knochenbrüchen,

Knochentumoren, Knochenzysten oder im periprothetischen Bereich (um Prothesen herum). Sie betrifft ebenso die Behandlung chronischer Gelenkerkrankungen.

Des weiteren bezieht sich die erfindungsgemäße Verwendung der Chips (Module) auf die Herstellung osteochondraler Knorpel-Knochen-Transplantate oder modellierbarer Knorpel- oder Knochen-Transplantate. Sie ist auch auf die Reparatur von Defekten im Gelenkknorpel oder von Gelenkknorpelflächen gerichtet.

Die erfindungsgemäße Verwendung der neuen künstlichen Knochenchips betrifft des weiteren die Herstellung von komplexen vitalen Bioprothesen. Sie ist ferner darauf gerichtet,

- dass innerhalb eines zu behandelnden Knochendefekts unterschiedliche Knochenchips bzw. Hohlstrukturen mit unterschiedlichen Faktoren bzw. Zellen befüllt werden, auch darauf,
- dass die künstlichen Knochenchips vergleichbar oder ähnlich einem Klettverschluss auf Endoprothesen aufgebracht
- dass sie mit andern künstlichen Gewebestrukturen, z.B. mit Knorpelersatz, kombiniert
- dass sie durch Fibrinkleber, Acrylatkleber oder Laktidkleber miteinander und/oder mit dem umgebenden Gewebe verbunden oder
- dass die künstlichen Knochenchips mit Gelsubstanzen - Fibrin, Alginat, Hyaluronsäure, Kollagen oder Agarose - kombiniert werden.

- Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

### Ausführungsbeispiele

25

#### Beispiel 1:

Auffüllen eines Knochendefektes unregelmäßiger Dimension:

- Für einen periprothetischen Knochenaufbau werden während des chirurgischen Eingriffs Knochenprofilchips der Größe ein und zwei Quadratzentimeter und 2 und 4 mm Dicke aufeinanderengesetzt bzw. gesteckt und die Defekte damit gefüllt. Die Chips wurden zuvor mit fibrinvernetzten Periostzellen oder mesenchymalen Stammzellen gefüllt und unter osteogenen Bedingungen vorkultiviert.

Beispiel 2:

Herstellung osteochondraler Knorpel-Knochen-Transplantate:

Zwei aufeinander steckbare Chips werden jeweils mit einer Fibringel-Zellsuspension oder Hydrogelzellsuspension gefüllt. Als Zellen werden jeweils Periostzellen oder mesenchymale Bindegewebsvorläuferzellen verwendet. Ein Chip wird mit osteogenem Medium kultiviert, der zweite mit chondrogenem Medium. Zur Transplantation werden die Elemente ineinander gesteckt und mit Fibrin- oder Laktidkleber verklebt.

Beispiel 3:

Herstellung modellierbarer Knorpel- oder Knochentransplantate:

Mesenchymale Zellen werden in einer Faserstruktur durch Fibrinvernetzung verteilt. Die Faserstruktur besteht aus dünnen resorbierbaren Fasern aus PGLA und zusätzlichen plastisch formbaren Drähten bzw. Drahtgeflecht. Das Zell-Faserkonstrukt wird anschließend manuell den chirurgischen Erfordernissen angepaßt.

Legende zu den Figuren:

Figur 1: links: Zellverteilung abhängig von Faserverteilung und Zellanheftung; rechts: Zellen verteilt durch vernetzende Gelkomponenten, dadurch werden größere Abstände der Gerüstfasern ermöglicht.

Figur 2: Modulartige Knochenersatzstrukturen (künstliche Knochenchips) aus porösen resorbierbaren oder nichtresorbierbaren Gerüststrukturen werden über interkonnektierende Oberflächenprofile verbunden.

Figur 3: Mesenchymale Zellen werden in einer Faserstruktur (A) durch Fibrinvernetzung verteilt. Zusätzlich eingebrachte plastisch formbare Drähte (B) bzw. ein Drahtgeflecht ermöglichen eine definierte Formgebung/mechanische Stabilität entsprechend den chirurgischen Erfordernissen.

Figur 4: Osteochondrales Transplantat: A: Knorpeltransplantat, bestehend aus chondrogenen Zellen in einer Trägerstruktur (vorkultiviert unter chondrogenen Kulturbedingungen); B: Knochentransplantat, bestehend aus osteogenen Zellen in einer Trägerstruktur (vorkultiviert unter osteogenen Kulturbedingungen). Die Verbindung erfolgt über interkonnektierende Gerüststrukturen und/oder Gewebekleber.

Literaturverzeichnis

1. Sittering M, Buija J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR (1996) Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. Biomaterials 17:237-242.
2. Sittering M, Buija J: Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen. (1994: DE-Patent 4431598.8).  
Sittering M, Buija J: Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen. (1994: DE-Patent 4306661.5).
3. Sittering M, Schultz O, Burmester GR, Häupl T: Artificial tissues, methods for the production and the use thereof. US-Patent 5,932,459.
4. Sittering M, Loch A, Haisch A: Autologe Fibrinkleber (DE-Patent 19824306 A 19991125).
5. Breitbart, A. S., Grande, D. A., Kessler, R., Ryaby, J. T., Fitzsimmons, R. J., and Grant, R. T. (1998). Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. Plast Reconstr Surg 101, 567-74.
6. L. F. Freed et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. Bio/Technology. 12, 689-693, (1994).
7. M. Sittering, J. Buija, N. Rotter, D. Reitzel, W. W. Minuth, G. R. Burmester, Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. Biomaterials. 17, 237-242, (1996).
8. G. O. Hofmann, Biologisch abbaubare Knochenimplantate. Spektrum der Wissenschaft, 2, 46-50, (1997).
9. M. Sittering, J. Buija, N. Rotter, D. Reitzel, W. W. Minuth, G. R. Burmester, Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. Biomaterials. 17, 237-242, (1996).
10. Sittering M, Lukanoff B, Burmester GR, Dautzenberg H: Encapsulation of artificial tissues in polyelectrolyte complexes: Preliminary studies. Biomaterials, 1996, 17:1049-1051.).
11. A. Kahn, L. A. Pottenger, J. G. Albertini, A. D. Taitz, E. J. Thonar, chemical stabilisation of cartilage matrix. J. Surg. Res. 56, 302-308, (1994).

12. D. A. Grande, C. Halberstadt, G. Naughton, R. Schwartz, R. Manji, Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J. Biomed. Mater. Res.* 34, 211-220, (1997).
13. Redlich A, Perka C, Schultz O, Spitzer R, Häupl T, Burmester GR, Sittinger M: Bone  
5 engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. *J. Mat Sci.*, in press.
14. Y. Cao, J. P. Vacanti, K. T. Paige, J. Upton, C. A. Vacanti, Transplantation of chondrocytes Utilising a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear. *Plast. Reconstr. Surg.* 100, 297-302, (1997).
- 10 15. D. A. Grande, R. E. Schwartz, L. Zhou, M. Kwan, the durability and biomechanical properties of chondrocyte/collagen allografts. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 18, 731, (1993).
16. D. P. Speer, M. Chvapil, R. G. Volz, M. D. Holmes, Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 144, 326-335, (1991).
- 15 17. H. P. von Schroeder, M. Kwan, D. Amiel, R. D. Coutts, the use of polylactic acid matrix and periosteal grafts for the reconstruction of rabbit knee articular defects. *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 329-339, (1991).
18. C. Bassleer, P. Gysen, J. M. Foidart, R. Bassleer, O. Franchimont, Human chondrocytes in tridimensional culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 22, 113-119, (1986).
- 20 19. G. Verbruggen et al. The synthesis and immobilisation of cartilage-specific proteoglycan by human chondrocytes in different concentrations of agarose. *Clin. Exp. Rheumatol.* 8, 371-378, (1990).
20. Y. Cao, A. Rodriguez, M. Vacanti, C. Ibarra, C. Arevalo, C. A. Vacanti, Comparative study of use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of  
25 autologous porcine cartilage. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 9, 475-487, (1998).
21. K. Lindenhayn, C. Perka, R.-S. Spitzer, H.-H. Heilmann, K. Pommerening, J. Meinnicke, M. Sittinger, Retention of hyaluronic acid in alginate beads: Aspects for in vitro cartilage engineering. CCC, In press, (1998).
22. T. C. Laurent, Crosslinked gels of hyaluronic acid. *Acta chim. Scand.* 18, 274-275,  
30 (1964).
23. K. Sakurai, Y. Ueno, T. Okuyama, Crosslinked hyaluronic acid and its use, European Patent, 0161887, (1985).

24. T. Malson, B. Lindqvist, Gels of crosslinked hyaluronic acid for use as a vitreous humor substrate, PCT, 86/00079, (1986).
25. T. C. Laurent, J. R. E. Fraser, The properties and turnover of hyaluronan. Ciba Foundation Symp. Proc. 124, 9-29, (1986).
- 5 26. L. Benedetti et al. Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaff) implanted in rats. Biomaterials, 1, 1154-1160, (1993).
27. K. Tomihata, Y. Ikada, Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content. Biomaterials, 18, 189-195, (1997).
28. Sittering M, Perka C, Schultz O, Häupl T, G-R Burmester: Joint cartilage regeneration by  
10 tissue engineering. Z. Rheumatol, in press.
29. Evans CH, Robbins PD: Gene therapy for arthritis, Gene therapeutics: Methods and applications of direct gene transfer. Edited by JA Wolff. Boston, Birkhäuser, 321, (1994).
30. Kalden JR, Geiler T, Herrmann M, Bertling W: Gentherapie der rheumatoiden Arthritis - ein bereits anwendbares Therapieprinzip?; Z. Rheumatol, 57:139-47, (1998).
- 15 31. Herndon JH, Robbins PD, Evans CH: Arthritis: is the cure in your genes? J Bone Joint Surg Am; 81:152-7; (1999).
32. Kübler, Osteoinduktion und -reparation. Mund-Kiefer-Gesichtschir., 1, 2-25, (1997).

**Patentansprüche**

1. Künstliche Knochenchips aus bioresorbierbaren oder biokompatiblen Trägermaterialien und/oder Gerüststrukturen, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus durch Fibrin oder Hydrogel vernetzten Kombinationen von osteogenen Zellen und Faktoren bestehen, die zu aneinandersetzbaren geometrischen Körpern geformt worden sind.
- 2: Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Gerüststrukturen aus den Ebenen
- zellvernetztes Fibrin oder Hydrogel
  - stabilisierte Fasergerüste, die die vernetzten Zellen enthalten und
  - Makrogerüste, die aus den Fasergerüsten als modulare Hohl- und Profilkörper bestehen.
- 3: Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus porösen resorbierbaren oder nichtresorbierbaren Gerüststrukturen bestehen und die Gerüststrukturen plastische und/oder elastische Anteile besitzen.
- 4: Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Gerüststrukturen eine der folgenden Strukturen besitzen:
- Stützstrukturen - Faserstrukturen, Vliesstrukturen -  
Gitterstrukturen, verwebte Strukturen, Schaumstrukturen, Wattestructuren oder  
Strukturen mit interkonnektierender Porosität.
5. Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Faserstrukturen neben elastischen zusätzlich resorbierbare oder nicht-resorbierbare plastische verformbare Fasern, Bänder oder Stützdrähte enthalten.
6. Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Stützstrukturen und/oder Gerüststrukturen aus mehreren plastischen, elastischen und festen Phasen bestehen.



7. Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie in Form von röhrenförmigen/zylinderförmigen u- oder v-Profilen oder von Hohlprofilen vorliegen.
8. Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie  
5 vieleckig oder linsenförmig oder band-/bindenartig geformt vorliegen.
9. Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie je nach Defektsituation zu geometrischen Körpern - Würfel, Quader, Kugeln oder Zylinder - geformt vorliegen.
- 10  
10. Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie permeable Wände besitzen.
11. Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie  
15 zusätzlich permeable Membranen enthalten.
12. Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie über Oberflächenprofile - Nuten, Federn, Zacken, Spitzen, Löcher, Haken, Ösen oder klettverschlussartig - zusammengesteckt oder -gehakt werden.
- 20  
13. Künstliche Knochenchips nach Anspruch 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Faktoren FGF, TGF, BMP, Periostzellen, mesenchymale Stammzellen oder Osteoprogenitor-Zellen eingesetzt werden.
- 25  
14. Verfahren zur Herstellung von künstlichen Knochenchips nach Anspruch 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass Zellen oder Faktoren durch Fibrin oder Hydrogel vernetzt, die vernetzten Zellen in Gerüststrukturen stabilisiert und zu aneinandersetzbaren geometrischen Körpern geformt werden.
- 30  
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Gerüststrukturen aus den Ebenen
- Zellvernetzung durch Fibrin oder Hydrogel
  - Stabilisierung der vernetzten Zellen in Fasergerüsten

- Makrogerüste, die aus den Fasergerüsten als modulare Hohl- und Profilkörper zusammengesetzt sind bestehen.

5 16. Verfahren nach Anspruch 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Chips in vitro mit Zellen kultiviert oder unmittelbar vor oder nach Implantation durch Einspritzen in Hohlkörper/Hohlräume mit osteogenen Zellen oder Faktoren versetzt werden.

10 17. Verfahren nach Anspruch 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägermaterialien und/oder Gerüststrukturen mit osteogenen Zellen oder Faktoren kombiniert - gefüllt, getränkt und/oder gekoppelt - und zu aneinandersetzbaren geometrischen Körpern geformt werden.

18. Verfahren nach Anspruch 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen oder Faktoren vorkultiviert werden.

15 19. Verfahren nach Anspruch 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass den Zellen oder Faktoren zusätzlich Calciumphosphat beigemischt wird.

20 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass als Calciumphosphat alpha- oder beta-Tri-Calciumphosphat eingesetzt wird.

21. Verwendung der künstlichen Knochenchips nach Anspruch 1 bis 18 in der Chirurgie.

22. Verwendung nach Anspruch 21 zur Behandlung

25 22.1. von Knochendefekten nach Knochenbrüchen, Knochentumoren, Knochenzysten oder des periprothetischen Bereichs oder

22.2. chronischer Gelenkerkrankungen.

30 23. Verwendung nach Anspruch 21 zur Herstellung osteochondraler Knorpel-Knochen-Transplantate oder modellierbarer Knorpel- oder Knochen-Transplantate.

24. Verwendung nach Anspruch 21 zur Reparatur

24.1. von Defekten im Gelenkknorpel oder

24.2. von Gelenkknorpelflächen.

25. Verwendung nach Anspruch 21 und 23 zur Herstellung von komplexen vitalen Bioprothesen.

5

26. Verwendung nach Anspruch 21 und 22, dadurch gekennzeichnet, dass innerhalb eines zu behandelnden Knochendefekts unterschiedliche Knochenchips bzw. Hohlstrukturen mit unterschiedlichen Faktoren bzw. Zellen befüllt werden.

10

27. Verwendung nach Anspruch 21 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die künstlichen Knochenchips vergleichbar oder ähnlich einem Klettverschluss auf Endoprothesen aufgebracht werden.

15

28. Verwendung nach Anspruch 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die künstlichen Knochenchips mit andern künstlichen Gewebestrukturen wie Knorpelersatz kombiniert werden.

20

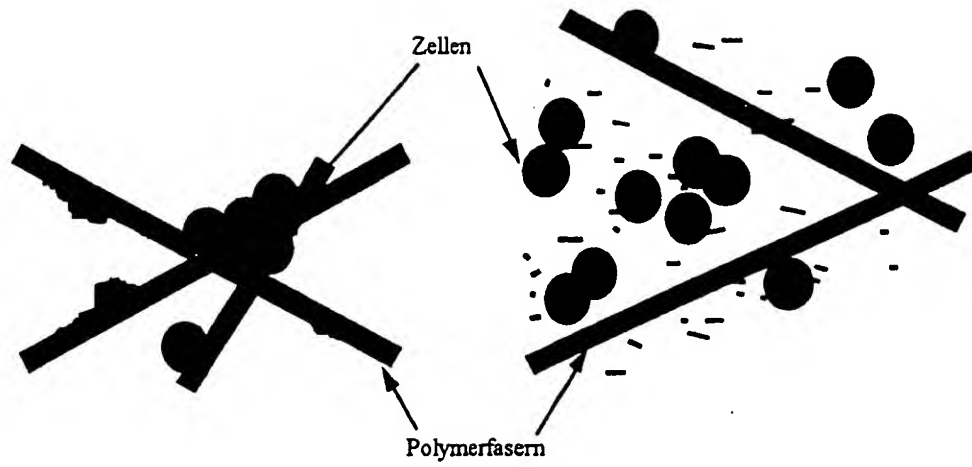
29. Verwendung nach Anspruch 21 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die künstlichen Knochenchips durch Fibrinkleber, Acrylatkleber oder Laktidkleber miteinander und/oder mit dem umgebenden Gewebe verbunden werden.

25

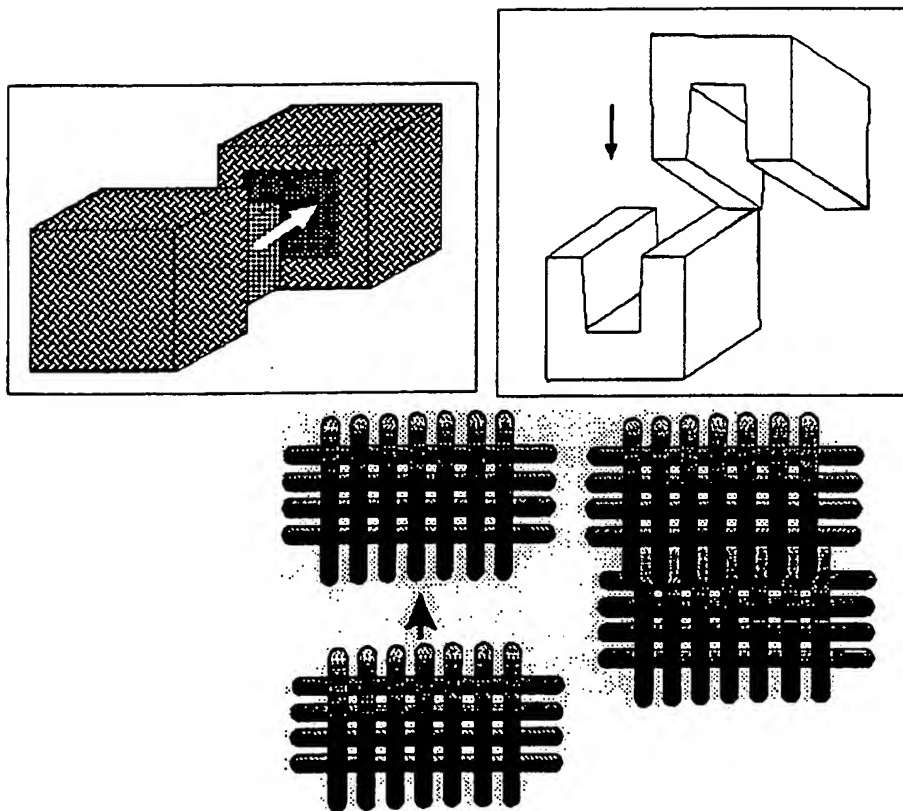
30. Verwendung nach Anspruch 21 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die künstlichen Knochenchips durch autolog hergestelltes Fibrin bzw. Thrombin oder rekombinantes Fibrin bzw. Thrombin miteinander und/oder mit dem umgebenden Gewebe verbunden werden.

31. Verwendung nach Anspruch 21 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die künstlichen Knochenchips mit Gelsubstanzen - Fibrin, Alginat, Hyaluronsäure, Kollagen oder Agarose - kombiniert werden.

Figur 1



Figur 2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**